UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

402

G. PICCI

ANCORA SULLA MICROFLORA PRESENTE NELLE OLIVE COLPITE DA *DACUS OLEAE* GMEL.

Estratto da « *Annali Facoltà Agraria* », Vol. XX - 1959

TIPOGRAFIA EDITRICE COMM. U. GIARDINI - PISA

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
18 MAR 1960

UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

402

G. PICCI

ANCORA SULLA MICROFLORA PRESENTE NELLE OLIVE COLPITE DA *DACUS OLEAE* GMEL.

Estratto da « *Annali Facoltà Agraria* », Vol. XX - 1959

TIPOGRAFIA EDITRICE COMM. U. GIARDINI - PISA

G. Picci (*)

ANCORA SULLA MICROFLORA PRESENTE NELLE OLIVE COLPITE DA *DACUS OLEAE* GMEL.

Le lesioni prodotte da Insetti su frutti carnosi sono causa di penetrazione di germi banali (e spesso anche fitopatogeni).

Questi, trovando nei costituenti dei frutti e nel loro elevato tenore idrico condizioni atte allo sviluppo e alla colonizzazione, finiscono con il determinare marciumi o ammuffimenti.

Si direbbe che il danno — in questi casi — provocato dall'insetto consegue, più che dalla lesione anatomica, dagli epifenomeni che, a seguito della stessa lesione, si stabiliscono nel frutto.

La nozione, in un certo senso, appare banale. Però, qualora si eccettuino alcune ricerche di Verona dirette ,sopratutto, a porre il problema (1), non si hanno studi che illustrino tali epifenomeni e, quindi, informino sulla natura delle varie infezioni certamente diverse, nei diversi frutti, giacchè presuntivamente condizionate — a parte l'influenza dell'ambiente — dalla natura del frutto.

Verona, nel ricordato lavoro, ha portato un primo contributo alla conoscenza della microflora che si insedia sui frutti di olivo colpiti da *Dacus olea*. Gmel e ha dato ragione dell'alta acidità che presentano gli oli vermati avendo egli rinvenuto, tra i microrganismi presenti, germi ad elevata attività lipolitica.

L'argomento ci sembra tuttavia meritevole di essere ripreso con l'esame di più numerosi campioni e con materiale proveniente da più regioni tra loro diverse e lontane.

Materiale e metodi

Allo scopo di avere materiale proveniente da zone diverse dalla nostra ove anche, naturalmente, abbiamo prelevato campioni, ci siamo rivolti alla

(*) All'esecuzione del presente lavoro ha collaborato l'Allievo interno Filiberto Loreti.

(1) O. Verona - *Sopra i microrganismi presenti nelle olive colpite da Dacus oleae e sulla loro attività lipolitica.* Ann. Fac. Agr., Pisa XI, 41, 1950.

cortesia di alcuni Osservatori per le Malattie delle Piante richiedendo campioni di olive vermate in Calabria, Campania, Puglia e Toscana. Ai Professori Costantino, Russo, Martelli e Melis, Direttori dei ricordati Osservatori, che hanno risposto premurosamente alla nostra richiesta, porgiamo i più vivi ringraziamenti.

Diremo che i campioni di olive vermate furono raccolti, per nostro suggerimento, sia in pianta che in terra.

Come i vari campioni pervenivano in Istituto, da ognuno di essi veniva scelto un certo numero di olive manifestamente vermate. Queste, dopo essere state accuratamente lavate e disinfettate, venivano macinate in mortaio sterile. La pasta ottenuta veniva quindi trasportata in un matraccio e dispersa, mediante agitazione, in un determinato volume di acqua sterile. Con gocce di tale sospensione (talvolta ulteriormente diluita) venivano inficiate capsule Petri allestite con: agar-nutritivo per l'isolamento dei batteri e con agar-Czapek e agar-malto per il rispettivo isolamento dei funghi e dei lieviti.

Incubazione a 26 °C. e conseguenti isolamenti.

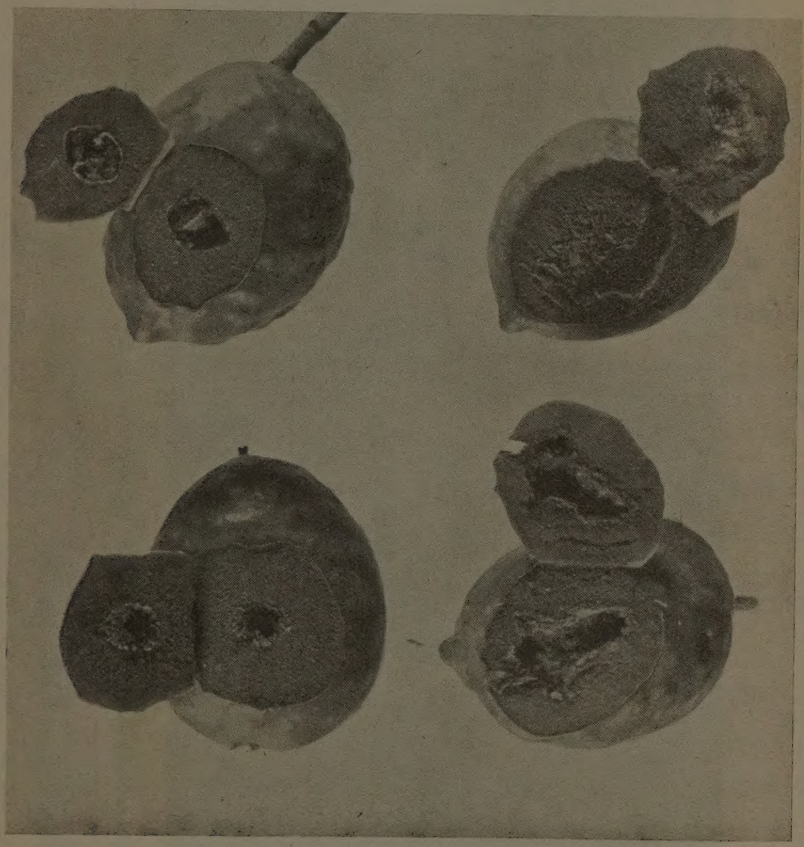
I vari isolati furono quindi studiati dal punto di vista sistematico e su di essi vennero eseguiti alcuni saggi di ordine enzimatico con riferimento alla proteolisi, alla aminolisi e alla lipolisi.

Per la rcerca della attività proteolitica sono state eseguite colture in gelatina segnando reperto positivo nei casi di avvenuta fluidificazione. Per la ricerca della attività amilolitica abbiamo applicato il metodo di Eckford (1). Per l'accertamento della attività lipolitica tra i diversi metodi proposti si è applicato il nuovo metodo di Sierra (2) per i batteri ed i lieviti

(1) Eckford, Martha, O. - *Thermophilic bacteria in milk*. Amer. J. of Hyg., 7, 201, (1927)

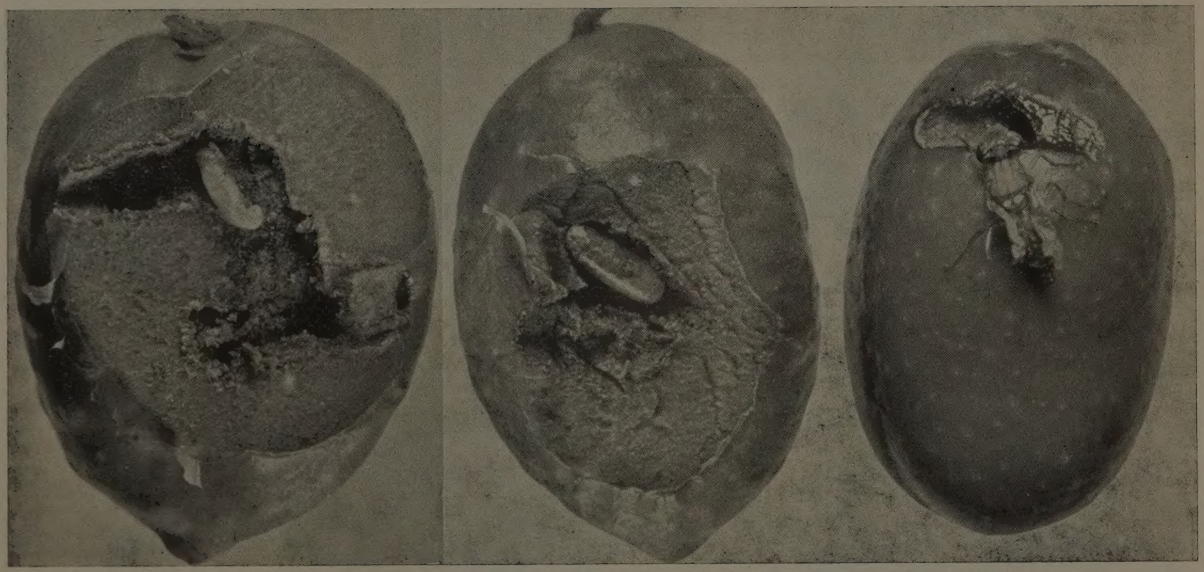
(2) G. Sierra - *A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates*. Ant. v. Leeuwenhoek, vol. 23, p. 15, 1957.

Il metodo proposto da Sierra consiste nello strisciare il germe che si desidera saggiare in un mezzo nutritivo addizionato di Tween e disteso su piastra. Dopo incubazione, il formarsi di cristalli di sali di calcio liberatisi (come mostra la figura) durante la lilpolisi dà indice di questa attività. Il dato + o — si fa seguire dal numero di giorni necessario alla comparsa dei ricordati cristalli. Ciò dà indice della velocità del processo.



Olive danneggiate da larve.

A sinistra: corrosioni inziali.
A destra: corrosioni dopo lo sfarfallamento.



A sinistra: larva rodente la polpa di un'oliva. Sono visibili, nel sarcocarpio, le profonde gallerie imbrattate di meconio e rosura.
In centro: oliva in sezione mostrante una pupa nella sua cavernetta superficiale.
A destra: adulto neo-sfarfallato in prossimità delle ferita.

e il metodo di EYRE (2) per gli Eumiceti.

RISULTATI DEGLI ISOLAMENTI

Origine dei ceppi.

I ceppi isolati furono 136 rispettivamente provenienti dalle località sotto indicate:

N°. dei ceppi	Località - Data del prelevamento Natura del campione
da 1 a 32	Montebianco (Monti Pisani), l'8-XI-1958, raccolte *in pianta*. Piante non trattate con antidacici.
da 33 a 39	Squillace (Catanzaro), l'11-XI-1958. Olive della cv. Caroleo raccolte *in terra* sotto pianta. Piante non sottoposte a trattamento antidacico.
da 40 a 52	c/s; olive, però, raccolte *in pianta*.
da 53 a 61	Immediate vicinanze di Bari il 20-XI-1958. Olive della cv. « Paesana » raccolte *in terra*.
da 62 a 66	c/s; olive, però raccolte *in pianta*.
da 67 a 79	Trabia (Palermo), il 24-XI-1958. Olive raccolte *in terra*.
da 80 a 84	Immediate vicinanze di Barletta il 12-XI-1958. Olive raccolte *in terra*.
da 85 o 87	c/s; olive, però, raccolte *in pianta*.
da 88 a 90'	Ugenta (Lecce), il 15-XI-1958. Olive raccolte *in pianta*. oliveto trattato con Rogor.
da 91 a 93	Adria (Bari), il 13-XI1958. Olive raccolte *in pianta*.
da 94 a 96	Pisa (Podere Sperimentale della Facoltà), il 1°-XII-1958. Olive della cv. « Frantoio » raccolte *in terra*.
97 e 98	c/s; della cv. « Moraiolo ». Olive raccolte *in terra*.
99 e 100	c/s.; raccolte *in terra*.
da 101 a 106	Varano (Foggia) il 15-XII-1958. Olive raccolte *in pianta*.
da 107 a 114	Ischitella (Foggia, il 16-XII-1958. Olive raccolte *in terra*.
da 115 a 123	Vierte (Foggia), i 116-XII-1958. Olive raccolte *in terra*.
da 124 a 130	c/s; olive, però, raccolte *in pianta*.

(2) J. C. EYRE - *Cultural studies on the Aspergilli, with special reference to lipase production of strains isolated from stored copra and cacao*. Ann. of Appl. Biolog., vol. 19, p. 351, 1932.

da 131 a 135 Castiglione della Pescaia (Grosseto), il 19-XI-1958. Olive raccolte *in pianta* in oliveto trattato con Rogor.
da 136 a 145 c/s; olive, però, raccolte *in terra*.
da 146 a 155 Vietri (Potenza); olive raccolte durante la battitura.

Riferimento sistematico dei ceppi.

(I numeri segnati con asterisco si riferiscono agli isolamenti effettuati da olive raccolte in pianta; da olive raccolte in terra gli altri).

Schizomiceti:

1 - *Micrococcus roseus* Fl.
ceppo n°. 41*
2 - *Micrococcus flavus* Trev.
n°. 113* e 120
3 - *Sarcina lutea* Schr.
ceppo n°. 1*
4 - *Bac. brevis* Migula
ceppi n°. 2*, 4*, 5*, 9*, 35, 37, 40*, 48*, 55, 58, 64*, 89*, 98, 128*, 134*, 142, 147*
5 - *Bac. cereus* Fr. et Fr.
ceppo n°. 97
6 - *Bac. megaterium* de Bary
ceppi n°. 42*, 49*, 83, 87*, 117, 141
7 - *Bac. pumilus* Gottl.
ceppi n°. 3*, 6*, 7*, 8*, 36, 51, 62*, 111*, 129*
8 - *Bac. subtilis* Cohn
ceppi n°. 10*, 63*, 95, 104*, 131*

Lieviti:

(9) 1 - *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Hansen) Dekker
ceppo n°. 21*
(10) 2 - *Pichia fermentans* Lodder
ceppo n°. 105*
(11) 3 - *Debaryomyces kloeckeri* Guill. et Peju
ceppi n°. 75, 102*
(12) 4 - *Debaryomyces subglobosus* (Zach.) Lodder et Kreger v. Rij
ceppo n°. 29*
(13) 5 - *Cryptococcus laurentii* (Kuff.) Skinner
ceppi n°. 16*, 30*, 31*

(14) 6 - *Candida guilliermondii* (Cast.) Lang et Guerra
ceppo n.° 100.
(15) 7 - *C. guilliermondii var. membranaefaciens* Lodder et Kr. - van Rij
ceppo n.° 154*
(16) 8 - *Candida intermedia* (Cif. et Ashf.) Lang. et Guerra
ceppo n°. 159
(17) 9 - *Candida parapsilopsis* (Ashf.) Lang. et Talice
ceppo n°. 71
(18) 10 - *Candida parapsilopsis* var. intermedia Van Rij et Verona
ceppi n°. 73, 78, 89*, 115, 130*, 148*, 153*
(19) 11 - *Candida pulcherrima* (Lindner) Wind.
ceppo n°. 124*
(20)12 - *Candida tenuis* Diddens et Lodder
ceppo n°. 76
(21)13 - *Rhodotorula glutinis* (Fres.) Harrison var. *rubescens* (Saito) Lodder
ceppo n°. 43*
(22) 14 - *Rhodotorula mucilaginosa* (Jorg.) Harrison
ceppo n°. 66*
(23)15 - *Trichosporon beherendii* Lodder et Kr. - van Rji
ceppo n°. 77 e 101*

E u m i c e t i :

(24) 1 - *Actinomucor elegans* (Eidam) B. et H. (*)
ceppo n°. 22*
(25) 2 - *Rhizopus nigricans* Ehr.
ceppi n°. 33, 34, 93*
(26) 3 - *Rhizopus* sp.
ceppo n°. 107*
(27) 4 - *Oospora* sp.
ceppo n°. 121
(28) 5 - *Geotrichum candidum* Link
ceppi n°. 39, 123, 135*, 151*
(29) 6 - *Fusidium* sp.
ceppi n°. 27*, 28*
(30) 7 - *Aspergillus glaucus* (gruppo)
ceppi n°. 15*, 23*
(31) 8 - *Penicillium purpurrescens* Sopp
ceppi n°. 12*, 32*, 69

(32) 9 - *Pen. frequentans* (Serie)
ceppi n°. 13*, 18*, 24*, 38, 44*, 45*, 47*, 52*, 65*, 67, 79, 82, 84, 88*, 125*, 126*, 145
(33)10 - *Penicillium* sp.
ceppi n°. 17*, 30*, 53, 72, 94, 99, 133*, 137, 139, 143, 144, 150*
(34)11 - *Cladosporium avellaneum*, f. *viride* de Vries
ceppo n°. 26*
(35)12 - *Cladosporium* sp.
ceppo n°. 54
(36)12 - *Alternaria cheiranthi* (Fr.) Bolle
ceppo n°. 61
(37)14 - *Alternaria tenuis* Nees
ceppo n°. 46*
(38)15 - *Fusarium vasinfectum* Atk.
ceppi n°. 92*, 146.
(39)16 - *Fusarium* sp.
ceppo n°. 60
(40)17 - *Fusarium* sp.
ceppi n°. 86*, 90*
(41)18 - *Fusarium* sp.
ceppi n°. 90*, 103*, 106*, 109, 110, 112, 114
(41)19 - *Fusarium* sp.
ceppo n°. 85*
(42)20 - *Fusarium* sp.
ceppo n°. 91*
(43)21 - *Fusarium* sp.
ceppo n°. 121*
(44)22 - *Fusarium* sp.
ceppo n°. 116
(45)23 - *Pullularia pullulans* (de Bary) Berk.
ceppi n°. 14*, 29*, 96

Proteolisi, amilolisi e lipolisi, nei ceppi isolati

Aveva certamente interesse saggiare alcune attività enzimatiche dei vari ceppi isolati. Particolarmente importante ci è apparsa la ricerca della possibile produzione di lipasi; ma interessante, altresì, la ricerca di eventuali altre attività degradative.

I risultati raccolti sono stati i seguenti:

Schizomiceti		Proteolisi	Amilolisi	Lipasi
Micr. flavus Trev.	ceppo 113	+	—	+ (2)
	» 120	+	—	+ (9)
Micr. roseus Fl.	ceppo 41	+	—	+ (6)
Sarcina lutea Schr.	ceppo 1	+	—	+ (4)
Bac. brevis Migula	ceppo 2	+	—	+ (6)
	» 4	+	—	+ (10)
	» 5	+	—	+ (8)
	» 9	+	—	+ (4)
	» 35	+	—	+ (8)
	» 37	+	—	+ (10)
	» 40	+	—	+ (6)
	» 48	+	—	+ (10)
	» 55	+	—	+ (10)
	» 58	+	—	+ (4)
	» 64	+	—	+ (4)
	» 89	+	—	+ (6)
	» 98	+	—	+ (10)
	» 128	+	—	+ (13)
	» 134	+	—	+ (7)
	» 142	+	—	+ (10)
	» 147	+	—	+ (7)
Bac. cereus Fr. et Fr.	ceppo 97	+	+	+ (10)
Bac. megaterium de Bary	ceppo 42	+	+	+ (6)
	» 49	+	+	+ (10)
	» 83	+	+	+ (8)
	» 87	+	+	+ (6)
	» 117	+	+	+ (4)
	» 141	+	+	+ (10)
Bac. pumilus Gottheil	ceppo 3	+	—	+ (13)
	» 6	+	—	+ (7)
	» 7	+	—	+ (7)
	» 8	+	—	+ (4)
	» 36	+	—	+ (10)
	» 51	+	—	+ (10)
	» 62	+	—	+ (10)
	» 111	+	—	+ (10)
	» 129	+	—	+ (4)

Bac. subtilis Cohn	ceppo 10	+	+	+ (10)
	» 63	+	+	+ (10)
	» 95	+	+	+ (5)
	» 104	+	+	+ (6)
	» 131	+	+	+ (7)

L i e v i t i		Proteolisi	Amilolisi	Lipasi
Sacch. cerevisiae var. *ellipsoideus* (Hansen) Dekker	ceppo 21	—	—	+ (6)
Pichia fermentans Lodder	ceppo 105	—	—	—
Debaryomyces kloeckeri (Guill. et Peju)	ceppo 75	—	—	+ (4)
	» 102	—	—	+ (4)
Debaryomyces subglobosus (Zach.) Lodder et Kreger v. Rij	ceppo 29	—	—	+ (3)
Cryptococcus laurentii (Kuff.) Sckinner	ceppo 16	—	—	+ (8)
	» 30	—	—	+ (6)
	» 31	—	—	—
Candida guilliermondii (Cast.) Lang. et Guerra	ceppo 100	—	—	+ (6)
C guill. var. *membranaefaciens* Lodder et Kr. v. Rij	ceppo 154	—	—	+ (5)
Candida intermedia (Cif. et Ashf.) Lang. et G.	ceppo 59	—	—	+ (7)
Candida parapsilosis (Ashf.) Long. et G.	ceppo 71	—	—	+ (6)
C. paraps. v. *intermedia* van Rij et Verona	ceppo 73	+	—	+ (6)
	» 78	+	—	+ (6)
	» 89	+	—	+ (7)
	» 115	+	—	+ (5)
	» 130	+	—	+ (6)
	» 148	+	—	+ (8)
	» 153	+	—	+ (5)
Candida pulcherrima (Lind.) Wind	ceppo 124	—	—	+ (8)
Candida tenuis Did et Lodder	ceppo 76	—	—	—

Rhodotorula glutinis var. *rubescens* (Saito) Lodder	ceppo 43	—	—	+ (8)
Rhod. mucilaginosa (Jörg) Harr	ceppo 66	+	—	+ (9)
Trichosporon beherendii Lodder et Kreger v. Rij	ceppo 71	—	—	—
	» 101	+	—	+ (10)

E u m i c e t i		Proteolisi*	Amilolisi	Lipasi**
Actinomucor elegans (Eiam) B. et K.	ceppo 22	+	—	+ (17,5)
Rhizopus nigricans Ehr.	ceppo 33	—	—	+ (13.5)
	» 34	—	—	+ (10.2)
	» 93	—	—	+ (10 —)
Rhizopus sp.	ceppo 107	—	—	+ (21 —)
Oospora sp.	ceppo 121	+	—	+ (18.5)
Geotrichum candidum Link	ceppo 39	—	—	+ (5.1)
	» 123	—	—	+ (4.6)
	» 135	—	—	+ (4.8)
	» 151	—	—	+ (6.—)
Fusidium sp.	ceppo 27	+	—	+ (19.2)
	» 28	+	—	+ (10.—)
Aspergillus glaucus (gruppo)	ceppo 15	+	+	+ (20.—)
	» 23	+	—	+ (18.2)
Penicillium frequentans (serie)	ceppo 13	+	+	+ (11.—)
	» 18	+	+	+ (2.3)
	» 24	+	+	+ (6.—)
	» 38	+	+	+ (13.—)
	» 44	+	+	+ (20.—)
	» 45	+	+	+ (21.—)
	» 47	+	+	+ (8.—)
	» 52	+	+	+ (7.5)
	» 65	+	+	+ (7.5)
	» 67	+	+	+ (6.—)
	» 79	—	—	+ 13.4)

(*) Nei casi positivi fu comunque lenta o molto lenta.

(**) Il numero tra parentesi indica i cc. di NaOH-N/10 occorsi a neutralizzare 100 cc di liquido colturale addizionato di ugual volume di una emulsione in acqua di monobutirrina all'1%. Incubazione 3 gg. a 30°C.

	» 82	+	+	+ (11.—)
	» 84	+	+	+ (6.—)
	» 88	+	+	+ (6.3)
	» 125	—	+	+ (9.8)
	» 126	—	+	+ (9.8)
	» 145	—	+	+ (4.—)
Penicillium purpurrescens Sopp	ceppo 12	+	+	+ (5.—)
	» 32	+	+	+ (5.—)
	» 69	+	+	+ (4.—)
Penicillium sp.	ceppo 17	—	—	+ (14.5)
	» 30	+	+	—
	» 53	+	+	—
	» 72	+	+	+ (4.9)
	» 94	+	—	+ (2.—)
	» 99	+	—	—
	» 133	+	—	+ (4.—)
	» 137	+	+	+ (8.5)
	» 139	—	+	—
	» 143	—	+	+ (9.—)
	» 144	—	+	+ (2.—)
	» 150	—	+	—
Cladosporium avellaneum de Vries	ceppo 26	+	+	+ (19.—)
Cladosporium sp.	ceppo 54	+	+	+ (20.—)
Alternaria cheiranti (Fr) Boll.	ceppo 61	+	—	—
Alternaria tenuis Nees	ceppo 46	+	—	—
Fusarium vasinfectum Atk.	ceppo 92	+	—	+ (6.—)
	» 146	+	—	+ (7,7)
Fusarium sp.	ceppo 60	+	—	+ (15)
	» 86	+	—	+ (31.9)
	» 90	+	—	+ (26.5)
Fusarium sp.	ceppo 90'	+	—	+ (21.5)
	» 103	+	—	+ (6.—)
	» 106	+	—	+ (18.—)
	» 109	+	—	+ (22.5)
	» 110	+	—	+ (32.5)
	» 112	+	—	+ (22.6)
	» 114	+	—	+ (20.—)
Fusarium sp.	ceppo 85	+	—	+ (30.—)
Fusarium sp.	ceppo 91	+	—	+ (15.2)

Fusarium sp.	ceppo 121'	+	—	+ (18.—)
Fusarium sp.	ceppo 116	+	—	+ (6.—)
Pullularia pullulans (de Bary) Berk.	ceppo 14	—	—	+ (6.—)
	» 19	—	—	+ 5.2)
	» 96	—	—	+ 8.—)

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Batteri, lieviti e funghi sono apparsi sempre presenti nelle olive colpite da *Dacus* che abbiamo esaminato.

Tra i batteri sono risultate rare le forme cocciche; abbondanti invece le forme sporigene. Tali, in parte, anche i precedenti reperti di Verona.

Tra i lieviti — a parte qualche rinvenimento che si può ritenere accidentale — si sono viste dominare forme asporigene del Genere *Candida* rilevandosi, anche in queste ricerche, la frequente presenza di *C. parapsilopsis* var. *intermedia* v. Ry et Verona.

C'è da ritenere che questa specie trovi il suo habitat naturale nei materiali oleosi essendosi rinvenuta anche su sanse. Tra i funghi a micelio sono risultati dominare rappresentanti dei Generi *Penicillium* e *Fusarium*.

Per quanto si riferisce ad alcune loro attività biochimiche e cioè alla produzione di proteasi, amilasi e lipasi è risultato quanto segue.

L'attività proteolitica è risultata positiva per tutte le specie e ceppi di Schizomiceti. Nell'ambito dei lieviti si è trovato fluidificante — tra tutti i ceppi isolati — *C. parapsilopsis* v. *intermedia*, il 35% circa del numero totale dei ceppi. Per i funghi l'attività proteolitica si è trovata presente nel 70% circa dei ceppi isolati; in ogni caso però si è vista manifestarsi lenta o molto lenta.

L'attività amilotlica, scarsa nei batteri (solo il 28% dei ceppi ha dato reperto positivo), assente nei lieviti, figura maggiormente presente nei funghi essendo risultato attivi il 42% dei ceppi. Peraltro tale attività si è limitata ai soli penicilli.

L'attività lipolotica si è riscontrata positiva, ma relativamente lenta per tutti i batteri. Anche i lieviti hanno dato, per la quasi totalità, reperto positivo mostrandosi anzi piuttosto energici. Per quanto concerne i funghi a micelio questi, nelle specie e ceppi isolati, si sono pure dimostrati più o meno lipolitici riscontrandosi particolarmente attive le varie specie di *Fusarium*.

Ancora una volta viene quindi dimostrata la presenza di forme microbiche nelle olive lesionate da *Dacus*. Considerato che tali forme micro-

biche manifestano attività degradative, è facile scorgere il danno che esse recano al prodotto. Nel caso di frutti oleosi — quali le olive — il danno stesso si vede particolarmente legato alla produzione di lipasi.

Riassunto. — *Vengono condotte ulteriori ricerche sulla microflora delle olive colpite da* Dacus oleae *Gmel. Le forme microbiche isolate — 157 ceppi tra batteri, lieviti e funghi — vengono saggiate nei confronti delle proprietà proteolitica, amilolitica e lipolitica. Contrariamente alle prime due, la proprietà lipolitica viene riscontrata quasi sempre positiva in tutte le specie isolate. Questo conferma ancora una volta che il danno maggiore che si riscontra nell'olio ottenuto da olive vermate risulta particolarmente legato alla produzione di lipasi.*